

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-001477

(43)Date of publication of application : 06.01.1999

(51)Int.Cl.

C07D243/24

A61K 31/55

A61K 31/55

A61K 31/55

C07D403/06

(21)Application number : 09-170983

(71)Applicant : HOKURIKU SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 12.06.1997

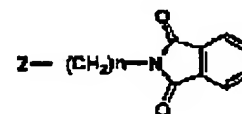
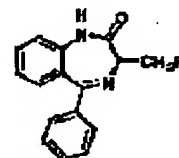
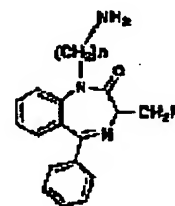
(72)Inventor : WATANABE YOSHINARI
KIMURA TATSUYA
KABURAGI HIROSHI
IWASAKI NOBUHIKO
IKEDA YOSHITAKA

(54) 1,4-BENZODIAZEPINE AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound, having an excellent affinity for a thrombopoietin receptor and useful as an agent capable of manifesting regulating actions on the blood platelet production.

SOLUTION: This 1,4-benzodiazepine derivative is represented by formula I [R is phenyl or indolyl; (n) is 2-6] or its salt, e.g. (\pm)-1-(2-aminoethyl)-1,3-dihydro-5-phenyl-3-(phenylmethyl)-2H-1,4-benzodiazepin-2-one. The compound represented by formula I is obtained by reacting a compound represented by formula II with a compound represented by formula III (Z is an eliminable group such as a halogen or mesyloxy) in the presence of a base and then reacting the resultant compound with hydrazine hydrate or methylamine in a polar solvent such as ethanol. The compound represented by formula I is effective against morbid states of blood diseases associated with an abnormality in the number of blood platelets.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-1477

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 D 243/24	5 0 6	C 0 7 D 243/24	5 0 6
A 6 1 K 31/55	A B Y	A 6 1 K 31/55	A B Y
	A C B		A C B
	A E D		A E D
C 0 7 D 403/06	2 0 9	C 0 7 D 403/06	2 0 9
審査請求 未請求 請求項の数2 F D (全 8 頁)			

(21) 出願番号 特願平9-170983

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月12日

(71) 出願人 000242622

北陸製薬株式会社

福井県勝山市猪野口37号1番地1

(72) 発明者 渡辺 良成

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 木村 達也

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72) 発明者 蕪城 博

福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

最終頁に続く

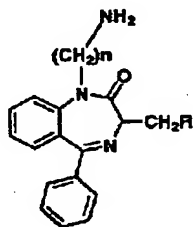
(54) 【発明の名称】 1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 トロンボポエチンレセプターに優れた親和性を有し、血小板産生調節作用を持つ薬剤を提供する。

【解決手段】 次の一般式

【化1】

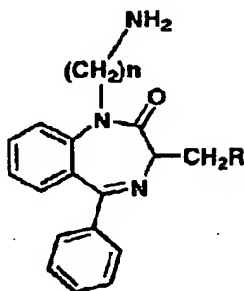


(式中、Rはフェニル基又はインドリル基を表し、nは2～6の整数を表す。)で示される1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩は、トロンボポエチンレセプターに優れた親和性を有し、血小板産生調節作用を持つ薬剤として極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】次の一般式

【化1】



(式中、Rはフェニル基又はインドリル基を表し、nは2～6の整数を表す。)で示される1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩。

【請求項2】請求項1に記載の1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩を有効成分とする血小板産生調節剤。

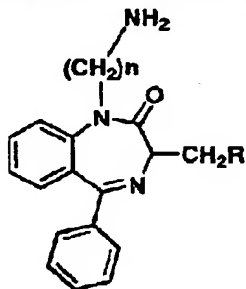
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、巨核球造血、血小板産生に深く関わるトロンボポエチンレセプターに親和性を有し、血小板産生調節作用を持つ新規な1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩、及びその用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】血小板は生体の止血、血栓形成において主要な役割を果たす血液有形成分である。血小板は骨髓幹細胞から巨核球前駆細胞より骨髓で分化、成熟して生じた巨核球より血中に放出され、その寿命は約10日であり、その数は長期にわたって一定の値を保つことが知られていた。この巨核球造血の過程の主要な因子であるトロンボポエチンの遺伝子が最近クローニングされた〔ネイチャー(Nature), 369巻, 533頁(1994年)〕。トロンボポエチンはc-mpl がコードしているタンパク質(トロンボポエチンレセプター: MPL)のリガンドであり、巨核球前駆細胞から巨核球細胞の増殖と分化成熟を刺激*



(式中、Rはフェニル基又はインドリル基を表し、nは2～6の整数を表す。)で示される新規な1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩、及びその用途を提供するものである。

*し、さらに血小板産生を増加させることも判明した〔ネイチャー, 369巻, 568頁(1994年)〕。

【0003】トロンボポエチンレセプターを介して血小板産生を調節する生理活性物質としては、トロンボポエチンそのものの他、低分子ペプチドなどにもトロンボポエチンレセプター親和性があることが知られてきている(WO96/40189号、WO96/40750号明細書)。

【0004】

- 10 【発明が解決しようとする課題】トロンボポエチンや上記低分子ペプチドなどの生理活性物質は、トロンボポエチンレセプターを介して血小板産生を調節し、血小板数の異常を伴う種々の血液疾患の病態に対して優れた薬剤として期待されている。しかしながら、トロンボポエチンは332個のアミノ酸からなるポリペプチドサイトカインであり、薬剤として用いる場合、消化管内で分解されると予測され、注射剤としては利用できるが、経口投与製剤としては実用的ではないと考えられる。また、トロンボポエチンレセプターに親和性を有する低分子ペプチドも、経口投与の可能性が未知数であることなどから、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有し経口投与可能な、低分子非ペプチド化合物の開発が望まれている。

【0005】本発明の課題は、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有し、且つ経口投与可能な低分子非ペプチド化合物を見だし、血小板数の異常を伴う種々の病態に対し優れた効果が期待できる治療薬を提供することにある。

【0006】

- 30 【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明に係る1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩が、優れたトロンボポエチンレセプター親和性を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明は次の一般式(I)

【化2】

(I)

【0008】本発明の前記一般式(I)で示される化合物と類似構造を有する1,4-ベンゾジアゼピン誘導体は、特開昭61-63666号、特開昭63-238069号及びジャーナル・オブ・メディシナル・ケミスト

リー(Journal of Medicinal Chemistry), 30巻, 1229頁(1987年)等においては、CCK拮抗剤として開示され、またWO95/14470号ではカリウムイオン遮断による不整脈治療剤として開示されているが、これら文献には本発明に係るトロンボポエチンレセプター親和性については全く触れられていない。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(I)において、Rで示されるフェニル基又はインドリル基は、適宜置換していてもよく、又(CH₂)_nで示されるアルキレン鎖としては、例えば、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン鎖が挙げられる。また、本発明の前記一般式(I)で示される化合物には、不斉に基づく異性体が存在し得るが、本発明にはこれらの異性体及びその混合物も包含される。

【0010】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、所望に応じて薬理学的に許容しうる塩に変換することも、又は生成した塩から遊離塩基に変換することもできる。本発明の薬理学的に許容しうる塩としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、20 磷酸等の鉱酸塩、あるいは、酢酸、マレイン酸、フマル酸、クエン酸、シュウ酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、10-カンファースルホン酸等の有機酸塩等が挙げられる。

【0011】本発明の1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体の好ましい態様としては、以下の化合物及びそれらの薬理学的に許容しうる塩を挙げることができるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

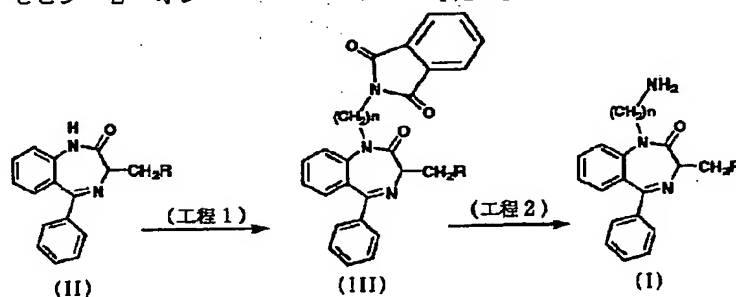
- (1) (±)-1-(2-アミノエチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 30
- (2) (±)-1-(3-アミノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

- * (3) (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (4) (±)-1-(5-アミノペンチル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (5) (±)-1-(6-アミノヘキシル)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (6) (±)-1-(2-アミノエチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (7) (±)-1-(3-アミノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (8) (±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (9) (±)-1-(5-アミノペンチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
- (10) (±)-1-(6-アミノヘキシル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン

【0012】本発明の前記一般式(I)で示される化合物は、以下の方法により製造することができるが、当該化合物の製造方法は、この方法に限定されるわけではない。

【0013】

【化3】

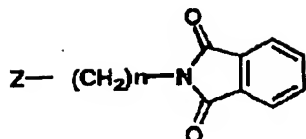


(式中、R及びnは前述と同意義を表す。)

【0014】即ち、工程1においては、特開昭61-63666号、特開昭63-238069号及びジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー、30巻、12

29頁(1987年)等が開示されている一般式(II)の化合物と、次の一般式(IV)

【化4】



(Zは塩素原子等のハロゲン原子又はメシルオキシ基等の脱離基を表し、nは前述と同意義を表す。)で示される化合物とを、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等の不活性溶媒中、水素化ナトリウム、リチウムジイソプロピルアミド等の塩基の存在下で、0℃から溶媒の還流温度までの範囲で反応させることにより、一般式(III)の化合物を得ることができる。

【0015】工程2においては、一般式(III)の化合物をエタノール等の極性溶媒中、抱水ヒドラジン又はメチルアミンと反応させることにより、本発明に係る前記一般式(I)の化合物を得ることができる。

【0016】このようにして製造される前記一般式

(I)で示される新規な1,4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩の少なくとも1つを有効成分として含有する医薬は、通常、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口投与剤、あるいは注射剤として投与される。これらの製剤は、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加剤を加え、常法により製造することができる。即ち経口剤にあっては、賦形剤(乳糖、D-マンニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等)、崩壊剤(カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等)、結合剤(ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム、タルク等)、コーティング剤(ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、酸化チタン等)、可塑剤(ポリエチレングリコール等)等の製剤用成分が、注射剤にあっては水性あるいは用時溶解型剤型を構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤(注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等)、pH調節剤(無機又は有機の酸あるいは塩基)、等張化剤(食塩、ブドウ糖、グリセリン等)、安定化剤等の製剤成分が使用される。

【0017】

【実施例】以下、本発明を例によって説明するが、本発明はこれらの例の特定の細部に限定されるものではない。

【0018】例1

(±)-N-[2-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]エチル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン 3.00g, 60%水素化ナ

(IV)

リウム0.34g及びN,N-ジメチルホルムアミド60mlの混合物を氷冷下1.5時間攪拌後、N-(2-ブロモエチル)フタルイミド4.60gを加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水200mlを加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン→ジクロロメタン:メタノール=20:1)により精製し、微黄色結晶0.94gを得た。この結晶の一部をジクロロメタン:酢酸エチル(3:1)の混合溶媒より再結晶して、融点224.5~228.5℃の微黄色結晶を得た。

元素分析値 C₂₄H₂₆N₂O₃

理論値 C, 75.82; H, 4.87; N, 10.40

実験値 C, 75.72; H, 4.90; N, 10.36

【0019】例2

(±)-N-[3-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]プロピル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン 3.00g, 60%水素化ナトリウム0.34g及びN,N-ジメチルホルムアミド60mlの混合物を氷冷下1.5時間攪拌後、N-(3-ブロモプロピル)フタルイミド4.50gを加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水200mlを加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン:メタノール=20:1)により精製し、微黄色結晶3.36gを得た。この結晶の一部をジクロロメタン:酢酸エチル(2:1)の混合溶媒より再結晶して、融点213~216℃の微黄色結晶を得た。

元素分析値 C₂₅H₂₈N₂O₃

理論値 C, 76.07; H, 5.11; N, 10.14

実験値 C, 75.85; H, 4.88; N, 10.12

【0020】例3

(±)-N-[4-[2,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル]ブチル]フタルイミド

(±)-1,3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1,4-ベン

ゾシアゼビン-2-オン 1.50 g, 60%水素化ナトリウム 0.17 g 及び N,N-ジメチルホルムアミド 30 ml の混合物を氷冷下 1 時間攪拌後、N-(4-プロモブチル)フタルイミド 2.48 g を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応混合物に水 100 ml を加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, ジクロロメタン:メタノール=50:1)により精製し、黄色無晶形固体 2.13 g を得た。

元素分析値 $C_{22}H_{22}N_2O_4$

理論値 C, 76.31; H, 5.34; N, 9.89

実験値 C, 76.18; H, 5.16; N, 9.85

[0021] 例 4

(±)-N-[3-{2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}プロピル]フタルイミド

(±)-1, 3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン 3.00 g, 60%水素化ナトリウム 0.40 g 及び N,N-ジメチルホルムアミド 50 ml の混合物を氷冷下 1 時間攪拌後、N-(3-プロモプロピル)フタルイミド 5.00 g を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に水 200 ml を加えた後、吸引濾過しガム状固体を得た。ガム状固体を酢酸エチルに溶かし、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, ヘキサン:酢酸エチル=2:1)により精製し、無色無晶形固体 4.40 g を得た。

元素分析値 $C_{27}H_{27}N_3O_4$

理論値 C, 77.17; H, 5.30; N, 8.18

実験値 C, 76.89; H, 5.63; N, 8.05

[0022] 例 5

(±)-1-(2-アミノエチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
(±)-N-[2-{2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}エチル]フタルイミド 1.02 g, 抱水ヒドラジン 0.10 ml 及びエタノールの混合物を 10 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, ジクロロメタン:メタノール=9:1)により精製し、黄橙色無晶形固体 0.15 g を得た。

IR スペクトル ν (KBr) cm^{-1} : 3344, 1676

, 1604

NMR スペクトル δ ($CDCl_3$) ppm : 2.49(2H, s), 2.79(1H, q, J=6.5 Hz), 2.89(1H, q, J=6.5 Hz), 3.65(1H, dd, J=13.6 Hz), 3.77-3.85(3H, m), 4.39(1H, td, J=13.6 Hz), 7.03-7.63(14H, m), 8.23(1H, s)

高分解能マスペクトル: $C_{26}H_{24}N_4O$

理論値 m/z : 408.1950

実験値 m/z : 408.1946

[0023] 例 6

(±)-1-(3-アミノプロピル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
(±)-N-[3-{2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}プロピル]フタルイミド 2.53 g, 抱水ヒドラジン 0.24 ml 及びエタノール 55 ml の混合物を 23 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をアセトンより再結晶し、融点 169.5~171.5°C の無色結晶 1.00 g を得た。

元素分析値 $C_{27}H_{26}N_4O$

理論値 C, 76.75; H, 6.20; N, 13.26

実験値 C, 76.43; H, 5.89; N, 13.03

[0024] 例 7

(±)-1-(4-アミノブチル)-1, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-5-フェニル-2H-1, 4-ベンゾジアゼピン-2-オン
(±)-N-[4-{2, 3-ジヒドロ-3-(1H-インドール-3-イルメチル)-2-オキソ-5-フェニル-1H-1, 4-ベンゾジアゼピン-1-イル}ブチル]フタルイミド 1.50 g, 抱水ヒドラジン 0.14 ml 及びエタノール 20 ml の混合物を 5 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(アルミナ, ジクロロメタン:メタノール=20:1→ジクロロメタン:メタノール=9:1)により精製し、微褐色無晶形固体 0.81 g を得た。

IR スペクトル ν (KBr) cm^{-1} : 3360, 1672, 1602

NMR スペクトル δ ($CDCl_3$) ppm : 1.22-1.57(4H, m), 2.53(2H, dd, J=13.5, 6.5 Hz), 3.63-3.71(2H, m), 3.78-3.84(2H, m), 4.44(1H, td, J=14.7 Hz), 7.05-7.65(14H, m), 8.01(1H, s)

高分解能マスペクトル: $C_{28}H_{28}N_4O$

理論値 m/z : 436.2263

実験値 m/z : 436.2263

【0025】例8

(±)-1-(3-アミノプロピル)-1,3-ジヒドロ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン

(±)-N-[3-{2,3-ジヒドロ-2-オキソ-5-フェニル-3-(フェニルメチル)-1H-1,4-ベンゾジアゼピン-1-イル}プロピル]フタルイミド 3.70g, 抱水ヒドラジン 0.35ml 及びエタノール 40ml の混合物を 5.5 時間加熱還流した。放冷後、5%水酸化ナトリウム水溶液 200ml を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー(アルミナ、ジクロロメタン:メタノール=10:1)により精製し、淡桃色無晶形固体 0.99g を得た。

IR スペクトル ν (KBr) cm^{-1} : 3372, 1674, 1604

NMR スペクトル δ (CDCl_3) ppm : 1.52-1.66(2H, m), 2.44-2.52(2H, m), 3.60(2H, d, J=7Hz), 3.70(1H, ddd, J=14, 7, 5Hz), 3.79(1H, t, J=7Hz), 4.57(1H, td, J=14, 7Hz), 7.15-7.54(14H, m)

高分解能マスペクトル: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$

理論値 m/z : 383.1998

実験値 m/z : 383.2003

【0026】以下、本発明化合物の優れたトロンボエチンレセプター結合親和性を確認するため、トロンボエチンと被験化合物とのトロンボエチンレセプターに対する競合実験を行い評価した。

【0027】試験例1

ヒトトロンボエチンレセプター (MPL) 発現プラスミドの構築

(1) まず、ブランクハイブリダイゼーション法により、MPL cDNA の全領域を保持するファージクローンを得た。このために PCR 法によりヒト胎児肝 cDNA (CLONTECH 社製) からヒト MPL cDNA の一部を取得した。なお、MPL cDNA の開始コドンから終止コドンは GenBank M90102 に、開始コドンの上流の配列は EMBL X73551 に登録されている。PCR のためのプライマーは、MPL の開始コドンの A から数えて 331 塩基から 350 塩基の配列に基づいたセンスプライマー 5'-GTGCGTCTCTTCTTCCGCT-3' と、1888 から 1907 塩基配列に基づいたアンチセンスプライマー 5'-TCAAGCGTCTGCCAATAGC-3' を用いた。PCR は、Takara EX Taq (宝酒造社製) により添付の反応バッファーを用い通常の条件で行った。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、ゲルから SUPREC-01 (宝酒造社製) を用いて添付のプロトコールに従い回収した。回収した PCR 産物を、Rediprime DNA labelling system (アマシャム社製) を用いて、添付のプロトコールに従い [α - ^{32}P] dCTP でラベルし、プローブとした。これを用いて、Human Fetal Liver 5'-STRETCH cDNA library (CLONTECH 社

製) から、添付のプロトコールに従い、MPL cDNA のコーディング全領域と少なくとも開始コドンより上流 60 塩基以上を保持するファージクローンを単離し、常法に従ってファージを調製した。

(2) 次に PCR 法により、ヒト MPL 細胞外領域 cDNA (1 から 491 番目のアミノ酸配列) をコードする DNA を取得した。PCR のための鋳型は上記で得られたファージを用い、プライマーは MPL の開始コドンの 28 塩基上流から 17 塩基の配列に基づいたセンスプライマー 5'-CTAAGCGAGGCACACAG-3' と、486 から 491 番目のアミノ酸配列に基づいたアンチセンスプライマー 5'-GGTGACCCAGCGGCTCTCGGTGGC-3' を用いた。この際、MPL 細胞外領域タンパク質の C 末端領域が、ヒト IgG Fc と連結できるように BstEII サイトを入れ、さらに読み枠が一致するようにした。また、ヒト IgG Fc 領域 cDNA は、B. D. Bennett らの文献 [B. D. Bennett ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 266 巻, 23060 ~ 23067 頁, 1991 年] を参考にし、センスプライマー 5'-CCGCGTCACCGACAAACTCA-3' とアンチセンスプライマー 5'-GCACTCATTTACCCGGACAGGGA GA-3' を用いて、ヒト脾臓の QUICK-CLONE cDNA (CLONTECH 社製) を材料として、PCR 法により取得した。このようにして得られた PCR 産物を、以下に述べる工程に従って pCR3 (Invitrogen 社製) に組み込み、MPL 発現ベクターを構築した。

(3) PCR で得られた MPL 細胞外領域 cDNA とヒト IgG Fc 領域 cDNA を、EUKARYOTIC TA CLONING KIT (Invitrogen 社製) を用いて添付のプロトコールに従い、pCR3 哺乳細胞発現ベクターに挿入した後、大腸菌 TOP10 に形質転換した。得られた形質転換体のうち、発現できる正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従い大量培養した。この株から、常法に従いプラスミドを調製し、MPL (B)-pCR3、IgG Fc (B)-pCR3 と命名した。

(4) 約 200 μg の MPL (B)-pCR3 を、0.64 units の BstEII (東洋紡社製) と 200 units の ScaI (宝酒造社製) で切断後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、MPL cDNA 領域を含む 3085bp の DNA 断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から常法により DNA を抽出した。

(5) 約 20 μg の IgG Fc (B)-pCR3 を、40 units の BstEII (東洋紡社製) と 80 units の ScaI (宝酒造社製) で切断後、アルカリフォスファターゼ (東洋紡社製) にて脱リン酸化後、これをアガロース電気泳動に供した。該プラスミドより、IgG Fc 領域 cDNA を含む 4150bp の DNA 断片を含むゲル断片を切り出し、そのゲル断片から DNA を抽出した。

(6) (4) で得た DNA 断片 (約 30ng) と (5) で得た DNA 断片 (約 20ng) を、4.6 units の T4 DNA ライゲース (東洋紡社製) にて連結させた。エレクトロポレーション法により、大腸菌 XL1-Blue 株 (Stratagene 社製) に形質転換

した。得られた形質転換体のうち、発現できる正しい方向に挿入された株を選び、この株を常法に従い大量培養した。この株から、常法に従いプラスミドを調製し、MPL-IgG Fc(B)/pCR3と命名した。

【0028】試験例2

ヒトIgG Fc領域融合ヒトMPLタンパク質(MPL-IgG)を安定に発現するヒト胎児293細胞の作製とMPL-IgGの精製
MPL-IgG Fc(B)/pCR3で、エレクトロポレーション法〔渡辺良成：組織培養の技術 第三版〔応用編〕（日本組織培養学会編）、501～503頁、1996年〕によりヒト胎児293細胞を形質転換した。形質転換されたヒト胎児293細胞を、10%FCS含有DMEM培地で約2日間培養した後、0.4 mg/ml ジェネティシン（LIFE TECHNOLOGIES 社製）を含む10%FCS含有DMEMにて約2週間培養して、形質転換体を得た。この形質転換体を、約50%コンフルエントになるまで培養し、1%ニュートリドマ（ベーリンガー・マンハイム社製）を含むDMEM培地と交換し、培養を継続した。約1週間ごとに培地を交換しながら、3週間から4週間培養を続けた。この培地を遠心し、培養上清を回収した後、VacuCap™（Gelman Sciences 社製）を用いて濾過した。約7Lの培養上清から、HiTrap Protein G（ファルマシア社製）を用いて、添付のプロトコールに従いガラムクロマトグラフィーを行い、MPL-IgGを精製した。

【0029】試験例3

ELISA法を用いたトロンボポエチンと被験化合物との競合実験

マイクロタイター平板ウェルに、100 μl のPBS(-)で希釈した10 ng の MPL-IgG を4℃で終夜被覆した。被験体は被験化合物をDMSOに溶解後、PBS(-)/0.1% BSA / 0.05% Tween 20を用いて、最終DMSO含有率が5%となるようにトロンボポエチン（R&D 社製）溶液（最終濃度

* 度 1×10^{-10} M）と混ぜ合わせて作製した。ウェルよりMPL-IgG 溶液を取り除き、被験体を添加し、室温で1時間以上被覆した。この液を取り除き、200 μl の PBS (-) / 0.05% Tween 20でウェル底面を洗った後、ヤギ Anti-human TPO Neutralizing Antibody（R&D 社製）で、室温にて1時間以上インキュベートした。200 μl のPBS(-) / 0.05% Tween 20でウェルを洗った後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ヤギIgG 抗体（Chemicon International社製）で、室温にて1時間以上インキュベートした。200 μl の0.05% Tween 20を含むPBS(-)でウェルを洗った後、100 μl のTMB 溶液（DAKO 社製）を加え室温で5分間インキュベートした。100 μl の1M H₂SO₄（和光純薬社製）を加え反応を停止した。光学密度を450nmにて解析し、被験化合物を加えていない時のトロンボポエチンの結合を100%として、被験化合物によるトロンボポエチンの結合抑制を調べ、トロンボポエチンレセプターへの親和性を評価した。結果を図1に示す。この結果から明らかなように、本発明化合物はトロンボポエチンレセプターへの優れた親和性を示した。

【0030】

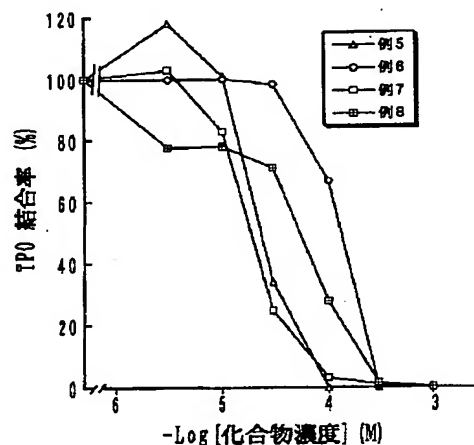
【発明の効果】本発明の前記一般式(1)で示される1, 4-ベンゾジアゼピン誘導体又はその薬理学的に許容しうる塩は、トロンボポエチンレセプターへの優れた親和性を有しており、血小板産生調節剤として極めて有用である。

【0031】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明化合物のトロンボポエチン（TPO）の結合抑制作用を測定し、本発明化合物のトロンボポエチンレセプターへの親和性を示した図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 岩崎 信彦
福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

(72)発明者 池田 佳隆
福井県勝山市猪野口37号1番地1 北陸製
薬株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.